

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-317030

(43)Date of publication of application : 03.12.1993

(51)Int.Cl.

C12M 1/00

C12M 1/32

C12M 1/36

F25B 21/02

H01L 35/28

(21)Application number : 04-128543

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 21.05.1992

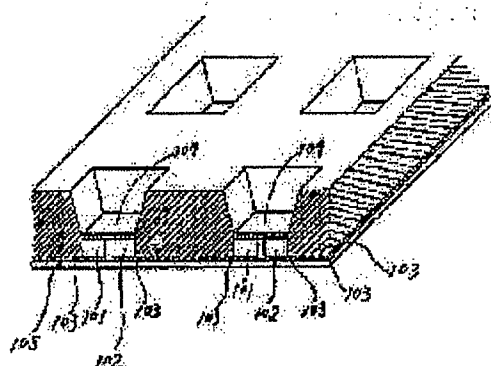
(72)Inventor : FUJITA TAKESHI
UMEMURA SHINICHIRO
UCHIDA NORITAKA

(54) BIOCHEMICAL REACTOR USING MICROCHAMBER

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an apparatus used for new biological and biochemical analyses enabling the simultaneous treatment of a trace amount of a sample under various reactional conditions, e.g. a microchamber apparatus for carrying out the biological polymeric reaction represented by a DNA or a protein and a method for its utilization and production.

CONSTITUTION: The biochemical reactor has many arranged chambers having $\approx 1.2\text{mm} \times 1.2\text{mm}$ opening area or $\approx 1.4\text{mm}$ depth and a temperature controlling function enabling the independent control in each chamber. Many holes are formed in a silicon wafer according to a semiconductor process and semiconductor Peltier elements (101 to 105) are formed in the interior thereof. The temperature can independently be controlled by controlling the applied voltage for each chamber.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

22.10.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

3099513

18.08.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

1. *Chlorophyll a* and *Chlorophyll b* were determined by the method of Lichtenthaler and Sponholz (1980).

DATE _____

100

[illegible]

| Trial | Control | MCI | AD |
|-------|---------|-----|----|
| 1 | 85 | 75 | 65 |
| 2 | 88 | 78 | 68 |
| 3 | 90 | 80 | 70 |
| 4 | 92 | 82 | 72 |
| 5 | 95 | 85 | 75 |

[illegible][illegible]

^a Data were obtained from the following studies: (1) *in vitro* studies by Kuo et al. [1986], (2) *in vivo* studies by Kuo et al. [1987], (3) *in vitro* studies by Kuo et al. [1988], (4) *in vitro* studies by Kuo et al. [1989], (5) *in vitro* studies by Kuo et al. [1990], (6) *in vitro* studies by Kuo et al. [1991], (7) *in vitro* studies by Kuo et al. [1992], (8) *in vitro* studies by Kuo et al. [1993], (9) *in vitro* studies by Kuo et al. [1994], (10) *in vitro* studies by Kuo et al. [1995], (11) *in vitro* studies by Kuo et al. [1996], (12) *in vitro* studies by Kuo et al. [1997], (13) *in vitro* studies by Kuo et al. [1998], (14) *in vitro* studies by Kuo et al. [1999], (15) *in vitro* studies by Kuo et al. [2000], (16) *in vitro* studies by Kuo et al. [2001], (17) *in vitro* studies by Kuo et al. [2002], (18) *in vitro* studies by Kuo et al. [2003], (19) *in vitro* studies by Kuo et al. [2004], (20) *in vitro* studies by Kuo et al. [2005], (21) *in vitro* studies by Kuo et al. [2006], (22) *in vitro* studies by Kuo et al. [2007], (23) *in vitro* studies by Kuo et al. [2008], (24) *in vitro* studies by Kuo et al. [2009], (25) *in vitro* studies by Kuo et al. [2010], (26) *in vitro* studies by Kuo et al. [2011], (27) *in vitro* studies by Kuo et al. [2012], (28) *in vitro* studies by Kuo et al. [2013], (29) *in vitro* studies by Kuo et al. [2014], (30) *in vitro* studies by Kuo et al. [2015], (31) *in vitro* studies by Kuo et al. [2016], (32) *in vitro* studies by Kuo et al. [2017], (33) *in vitro* studies by Kuo et al. [2018], (34) *in vitro* studies by Kuo et al. [2019], (35) *in vitro* studies by Kuo et al. [2020].

^a The number of subjects who were included in each group was 10.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-317030

(43)公開日 平成5年(1993)12月3日

| | | | | |
|--------------------------|------|---------|-----|--------|
| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| C 1 2 M 1/00 | A | | | |
| 1/32 | | | | |
| 1/36 | | | | |
| F 2 5 B 21/02 | B | 8919-3L | | |
| H 0 1 L 35/28 | Z | 9276-4M | | |

審査請求 未請求 請求項の数7(全 5 頁)

(21)出願番号 特願平4-128543

(22)出願日 平成4年(1992)5月21日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 藤田 毅

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

(72)発明者 梅村 晋一郎

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

(72)発明者 内田 憲孝

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

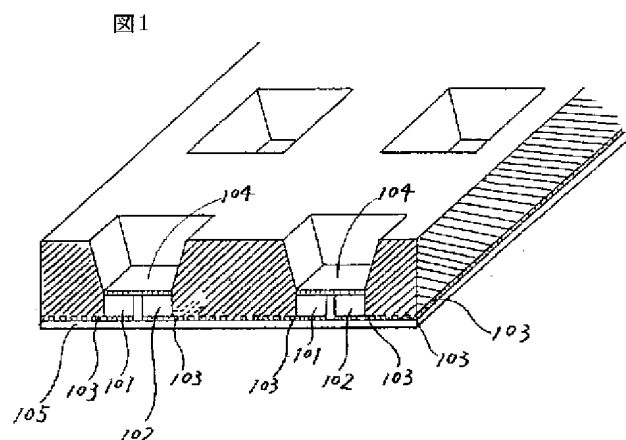
(74)代理人 弁理士 小川 勝男

(54)【発明の名称】 マイクロチャンバを用いた生化学反応装置

(57)【要約】

【目的】極微量のサンプルを様々な反応条件で同時に処理することが可能となる新規な生物学および生化学的分析に供する装置、例えばDNAや蛋白質に代表される生体高分子反応を行なうマイクロマルチチャンバ装置およびその利用方法、製造方法の提案

【構成】開口部面積1.2mm×1.2mm以下、もしくは深さ1.4mm以下のチャンバを多数配列し、各々のチャンバ内に独立に制御することの可能な温度調節機能を有する生化学反応装置。シリコンウェハに半導体プロセスにより多数の孔と、その内部に半導体ペルティエ素子(101~105)を形成する。チャンバ毎に印加電圧を制御することにより、独立に温度調節可能としたものである。



【特許請求の範囲】

【請求項1】二次元平面上に配列された多数の孔（チャンバ）を持つ生化学反応容器において、各々のチャンバに独立した温度調節が可能な温度調節機能を組み込んだことを特徴とする生化学反応装置。

【請求項2】前記生化学反応容器は12行×8列穴のマイクロタイタープレートであることを特徴とする請求項1記載の生化学反応装置。

【請求項3】前記各チャンバの大きさが、開口部において1.2mm×1.2mm以下の大きさであることを特徴とする請求項1記載の生化学反応装置。

【請求項4】前記各チャンバの大きさが、深さにおいて1.4mm以下の大きさであることを特徴とする請求項1記載の生化学反応装置。

【請求項5】母材をSiウエハとし、反応容器となるチャンバを前記Siウエハの一表面にエッチングにより成形し、チャンバ周囲を酸化することにより、チャンバを熱伝導率の低いSiO₂で囲まれた構造にすることを特徴とする請求項1記載の生化学反応装置。

【請求項6】母材をSiウエハとし、反応容器となるチャンバを前記Siウエハの一表面にエッチングにより成形し、その各チャンバ内に独立したペルティエ素子を配置し、各素子は独立して制御されることを特徴とする請求項1記載の生化学反応装置。

【請求項7】二次元平面上に配列された多数のチャンバを持つ生化学反応容器の、各々のチャンバに独立した温度調節が可能な温度調節機能を組み込んだ生化学反応装置を用いて核酸増幅反応を行うに際し、各チャンバごとに温度及び／または温度を保持する時間を独立に変化させることを特徴とする核酸増幅反応方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は生物学および生化学的分析に供する装置、例えばDNAや蛋白質に代表される生体高分子反応を行なうマイクロマルチチャンバ装置およびその利用方法、製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】多数の生化学的試料を同時に扱うマイクロマルチチャンバとしては、いわゆる12行×8列のマイクロタイタープレートを含むマイクロウエルテストプレートがあり、これに規格を同じくしたハンドリング装置やインキュベータ、遠心装置等の周辺装置も実用化されている。マイクロウエルテストプレートに反応装置として分離膜や機能膜を有するように設計されたマイクロフィルトレーショントレイとしては、特開平2-187110に見られるように、免疫学的検査やマイクロクロマトグラフなどを目的とした使い捨ての装置を提供するものがある。

【0003】しかし、現在実用化されているマイクロタイタープレートは単に試料を保持する容器でしかなく、

またマイクロフィルトレーショントレイについても、ウエル毎に独立に反応条件を制御することは非常に困難であり、特に温度調節を独立に行うことは不可能であると考えられる。

【0004】さらにまた、現在市販されているマイクロタイタープレートは、容量が10μl～1mlのオーダーの大きさのチャンバであり、極微量の試料を取り扱うことや高速で温度調節を行うには適していない。

【0005】一方、極微量の試料を扱うマイクロチャンバとしては、特公平2-34597号の“細胞を選別するための装置および方法”や、特開平-131569号の“マイクロチャンバプレートおよび粒子判別法ならびに粒子処理装置および細胞処理装置”がある。これらは細胞一個の大きさを扱うマイクロチャンバを提供し、かつ半導体プロセスによって組み込んだ電極等によって、独立に各チャンバに電圧を印加すること等についての方法および装置を提供しているが、どちらも主に細胞を取り扱うことを目的とするもので、DNAや蛋白質に代表される生体高分子反応を行うには最適とは言えないと考えられる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】生化学反応の主なものは、分離、精製、攪拌混合、インキュベート（反応温度保持）であり、これらを10³～10⁴個のオーダーで同時に処理できれば、現在の生化学的な仕事のスループットは飛躍的に向上すると考えられる。例えば、現在癌化と関係する様々な遺伝子およびその変異部位が同定されつつあり、その数は数百種類にも及んでいるが、これらの部位を同時に検査、検出できれば、診断の精度やスループットは大きく向上する。また遺伝子解析において、10000クローンを超える遺伝子ライブラリのスクリーニングなどを行なう上では、一枚のプレート上に少なくとも1000個以上のチャンバが並んでいることが望ましい。一方、医療診断や腫瘍細胞などの部位特異的発現機構を調べる上では、準備可能な検体試料の量の点から考えると、多数であると同時に微量の試料を取り扱う必要がある。

【0007】また近年発明されたイン・ヴィトロ（In vitro）での核酸増幅反応（PCR法）は、反応液の温度制御によって様々な新しい診断手法や実験手法を可能とし、その結果、生化学の研究作業の中でイン・ヴィトロで行うことのできる範囲がかなり拡大してきている。この場合に重要となってくるのは、反応液全体の均一かつ高速度な温度制御技術である。

【0008】従って本発明の目的は、まず微量の反応試料を十分な濃度で反応させ得る装置を提供するものである。また、反応液の温度制御をより迅速にかつ均一に行えるようにした装置を提供することにある。

【0009】さらに本発明の他の目的は、チャンバ自体を能動的な反応装置とすることにより、同時に多数の生

化学的試料を取り扱うことを可能とし、また必要に応じて個々の試料について独立に反応条件を設定することを可能とする装置を提供すること、加えてこの装置により可能となる新たなプロトコールの一例を提供するものである。

【0010】また、生化学の反応装置は、時として致命的な影響を与える混合汚染（コンタミネーション）を防ぐために使い捨て可能（ディスポーザブルタイプ）であることが好ましい。そこで、大量生産を可能とし、ディスポーザブルタイプの反応装置を提供することも本発明の目的である。

【0011】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するため、それぞれのチャンバを容量 $0.5\mu\text{l}$ 以下に微小化し、微量の反応液を効率良く取り扱えるようにした。

【0012】また、各チャンバ毎にペルティエ素子により形成されるヒータおよび冷却器を設け、そのヒータおよび冷却器に直接反応液を接触させることにより反応液の温度制御を行なえるようにした。

【0013】加えて、チャンバの加工に半導体プロセスを利用することにより、大量生産を可能とした。

【0014】

【作用】チャンバを微小化し微量の反応液を扱えるようにすることにより、微量の反応試料を十分な濃度で反応させることが可能となる。例えば、 $0.5\mu\text{l}$ の反応液の中で反応を行わせると、 $100\mu\text{l}$ の反応液の場合と同濃度の反応を行うためには $1/200$ の量の試料があれば良く、逆に言えば、同じ量の試料で濃度は200倍となる。このことは反応出発試料の微量化だけでなく、酵素等の使用量も少なくすることとなり、低コスト化にもつながると考えられる。

【0015】また、反応液の微量化に加えて各チャンバごとにヒータおよび冷却器を取付け、そのヒータおよび冷却器に直接反応液を接触させることにより、反応チャンバごとに反応液を独立に温度制御し、かつ、その温度制御を迅速に行うことが可能となる。チャンバ母材をシリコンとして、異方性エッチングによってチャンバとなる適当な体積の孔を掘った後、表面のある面に対して、PNPN…からなる半導体ペルティエ素子を形成し、各ペルティエに独立に配線を行い付加電圧を制御することにより、独立に温度制御（加熱も冷却も同一の素子により）が可能となる。また、すべてのチャンバ内加工が終了した後に、チャンバ周囲を酸化することにより、チャンバを熱伝導率の低い SiO_2 で囲まれた構造にすることも可能である。

【0016】このようにして作ったチャンバにおいては、ペルティエ素子の吸熱および発熱量の限界は、吸熱時 $0.15\text{W}/\text{mm}^2$ 、発熱時 $0.18\text{W}/\text{mm}^2$ 程度と見積もられる。この条件において、酵素反応の開始および終了を精度良く制御するための温度変化の速度を $\Delta 2$

$5^\circ\text{C}/\text{sec}$ 以上とすると、深さは最大でも 1.4mm 以下である必要がある。

【0017】一方、チャンバ加工を施す面積は、装置の小型化や手に入り易いシリコンウェハの大きさ、加工やハンドリングの容易さから判断して、 $80\text{mm}\times 80\text{mm}$ 以下の大きさの四角形状配列が良いと考えられる。先述のように、今後の遺伝子診断や遺伝子解析に用いる上では、一枚のウェハ上に少なくとも1000個のチャンバが並んでいることが望ましい。この場合 $80\text{mm}\times 80\text{mm}$ の正方形形状にチャンバの一边と同じピッチで1000個のチャンバを配列するためには、チャンバの一边は 1.2mm 以下であることが必要となる。

【0018】ところで、シリコンウェハを異方性エッチングにより加工する場合、開口部形状を正方形とすると、穴形状は正方形錐状となり、その底面と側面のなす角度は約 50° である。この形状において、深さをヒト卵細胞（直径約 $200\mu\text{m}$ ）が扱える $420\mu\text{m}$ とし、開口部を $1.2\text{mm}\times 1.2\text{mm}$ の正方形とするとペルティエ素子を形成する底面は $0.6\text{mm}\times 0.6\text{mm}$ の正方形形状となる。このようにして作ったチャンバにおいては、ペルティエ素子の吸熱および発熱量は、吸熱時 0.05W 、発熱時 0.06W 程度と見積もられるが、上記のような開口部 $1.2\text{mm}\times 1.2\text{mm}$ 、深さ 0.42mm の場合、体積は最大 $0.35\mu\text{l}$ となり $\Delta 25^\circ\text{C}/\text{sec}$ を満足する。ただし従来の温度調節器は、反応液をいれた反応チューブを恒温槽に装着することによって液温を調節していたので、チューブの熱抵抗やチューブとヒータ間の熱接触なども問題となっていたが、本発明のように加熱もしくは冷却器が直接反応液に接していれば、効果的な温度調節が可能である。

【0019】混合攪拌の点においても、反応液が微量であれば拡散の効果が大きくなる。拡散の速度は、およそ体積と比例関係にあるので、 $0.5\mu\text{l}$ の反応液中では $200\mu\text{l}$ の場合に比べて200倍の速さでランダムな混合が進むと考えられる。チャンバ全体に対して高周波の微小振動を加えることによって、拡散効果を助長することもできる。これだけでは十分といえない場合は、チャンバ内に三次元微細加工によって振動子もしくは回転子を構築する方法をとれば良い。たとえば、薄くしたシリコン板を静電気力によってたわませて、その静電気力をコントロールすることによって、シリコン薄膜を振動させる装置も実現されているが、この構造を利用することが考えられる。また、シリコンウェハ上に多数の静電モータを並べて作ることも可能である。

【0020】これらの加熱および冷却素子や攪拌要素を、半導体プロセスによって各チャンバごとに構築することによって、多数の反応装置が平面上に配列されたマイクロチャンバ装置を提供することが可能である。しかも半導体プロセスによれば、多数のマイクロチャンバを同時に加工することが容易であるので、装置自体をディ

スポーザブルにすることも可能となる。

【0021】このような装置を用いることによって、反応温度と反応時間をパラメータとした新しい実験手法が可能となる。例えば、PCR法を行なう場合には、変性温度、再会合温度、伸長温度の3種類の温度とその保持時間が、反応の効率（場合によっては生成産物の有無）を決定する。反応液の微量化により精度よく設定温度を制御し、かつ、反応液ごとに独立な温度制御の行い得る本装置を用いれば、同じ反応液に対して異なる設定温度で同時に反応を行ない、最適な実験条件における産物を迅速に得ることが可能である。またそれだけでなく、DNA配列中の点変異などが、敏感に最適再会合温度に影響することを利用して、遺伝子診断などをより正確に効率よく行なうことも可能となる。加えて本装置では、DNAポリメラーゼによる伸長時間を分解能良く制御することにより、反応生成物の特異性を向上させることも可能である。

【0022】

【実施例】以下、本発明の一実施例を図1～図4により説明する。図1、2は本発明のマイクロチャンバを用いた生化学反応装置、図3は上記装置を要素として組み込んだ自動試料調製装置である。また図1～図4において共通部分の番号は同一とした。

【0023】図1において、装置の母材はシリコンであり、異方性エッチングによってチャンバとなる適当な体積の孔を掘った後、底面に101～105からなる半導体ペルティエ素子が形成されている。101、102は拡散法（半導体プロセス）により形成したP型およびN型半導体、103はリード線、104はヒータおよび冷却プレート（温調プレート）、105は全ウェル共通の定温度接点である。定温度接点105を適当な温度に制御しておき、リード線103の両端に必要な電圧をかけることにより、104に示す温調プレートの温度をウェル毎に独立に制御可能である。また、リード線に電圧をかけず両端の電位差を測定すればこのペルティエ素子を温度計測用の熱電対として使用することも可能である。場合によっては、図2に示すようにウェル加工時に温調部分104と熱電対部分201を別々に形成することも可能である。本実施例においてウェルの大きさは、開口部は縦1.2mm×横1.2mmで深さ0.42mm、シリコン結晶面の特性から、底面は縦0.6mm×横0.6mmとなり、ウェルの容積は最大0.35 μ lとなる。

【0024】温調プレート104としてはペルティエ素子の銅電極をそのまま用いているが、銅電極の反応液に対する影響が重要な場合には、この電極の上をセラミックスアルミプレートや熱伝導性の良いポリマ等で覆うことにより対策する。

【0025】またウェルの周囲は酸化されたSiO₂となっており、熱絶縁の効果が母材のシリコンに比べて大

きくなるようになっている。

【0026】図3は図1に示したチャンバプレートを組み込んだ自動試料調製装置の鳥瞰図である。マイクロチャンバプレートを用いた反応装置100は台301に固定される。台301は、チャンバプレートの電極のソケットおよび定温度接点の温度制御のための温度調節器より構成されている。ウェル内の拡散の効果を高めるために高周波の振動をチャンバプレートに与えられるような構造にすることもできる。

10 【0027】302はピペッタ303とマイクロチャンバプレートのふた304を搬送するXYステージである。ピペッタ303はサブマイクロリットルの分注が可能なマイクロキャピラリーを用いたピペットを有し、極微量の試薬およびサンプルを精度よく分注することが可能である。このピペッタが、溶液保存容器305と反応装置100との間を往復しながらウェル内に反応液を供給する。超極微量の試薬の供給には、キャピラリーなどのピペットではなく単なる針先を用いる方法もある。すなわち、中空部分を持たず試薬に浸した針先の表面を濡らしている試薬を、針先を反応液に接触させることによって、反応液中に拡散させるのである。試薬の濃度および濡れ面積をコントロールすることにより超極微量の試料供給が可能となる。

30 【0028】ふた304はマイクロチャンバと同様な位置配列に浅い溝の加工をして、上面にペルティエ素子を形成したものである。このふた304は、分注時以外は、ウェルにたいして溝が一致するように押しつけられ（図4）、それぞれのウェルの反応液よりもわずかに（2～3℃）高い温度に制御される。このことによりウェル中の微量反応液の蒸発を防ぐことが可能である。

【0029】この自動試料調製装置は、分離機能膜等の分離要素、さらに多種類の試薬供給要素などと組み合わせることにより、非常に小型大量処理の生化学反応装置を構成し得ると考えられる。また今後の三次元微細加工技術の進歩により、ウェル中に攪拌要素や分離要素を含むチャンバプレートも実現可能であると考えられる。

40 【0030】本明細書においては、主に1 μ l以下の容量を持つマイクロチャンバプレートについて述べてきたが、本発明の重要項目である、独立した制御の可能な温度調節機能や攪拌、分離機能を各々のチャンバが有する反応装置に関しては、チャンバの大きさが制限を受けるものではなく、いわゆる12行×8列のマイクロタイタープレートに上記のような反応要素を組み込んだ反応装置も、本発明の含む範囲である。

【0031】

50 【発明の効果】本発明によれば、極微量のサンプルを様々な反応条件で同時に処理することが可能となる。このことにより、従来扱えなかった極微量のサンプルを出発試料とする、生化学反応の最適化、高スループット化を実現し、遺伝子解析や遺伝子診断の分野の発展に寄与で

きる。

【0032】また周辺装置との組合せにより、生化学反応自動装置の小型化を実現する。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例のマイクロチャンバプレートを用いた生化学反応装置

【図2】本発明の他の実施例のマイクロチャンバプレートを用いた生化学反応装置

【図3】図1で示した生化学反応装置を組み込んだ自動試料調製装置の一例を示す鳥瞰図

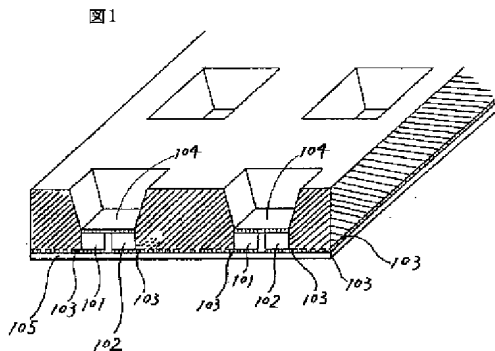
*【図4】図3で示した自動試料調製装置において、マイクロチャンバプレートにふた部プレートを装着した状態の図

【符号の説明】

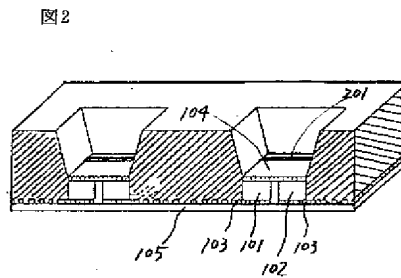
100…マイクロチャンバプレートを用いた生化学反応装置、101、102…P型およびN型半導体、103…リード線、104…温度調節プレート、105…定温度接点、201…熱電対部分、301…マイクロチャンバプレートの台、302…XYステージ、303…ピペッタ、304…マイクロチャンバプレートのふた

*10

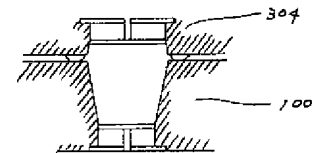
【図1】



【図2】



【図4】



【図3】

